

玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列的转基因 鉴定体系研究

郑洁, 杨力媛, 马国兴, 马登旭, 刘小川

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘要: 研究采用 pCAMBIA 1301 穿梭质粒和 LBA 4404 菌株, 侵染不同品种玉米成熟胚诱导的愈伤组织, 以构建玉米端粒酶 RNA 候选序列的转基因鉴定体系。构建了两个含有玉米端粒酶 RNA 的 pCAMBIA 1301 穿梭质粒, 一个携带模板区正常的玉米端粒酶 RNA 候选序列(野生型), 另一个携带模板区定点突变处理的端粒酶 RNA 候选序列(突变型), 然后分别侵染甜玉米成熟胚诱导的愈伤组织, 也同样分别侵染糯玉米成熟胚诱导的愈伤组织。结果表明: 在愈伤组织培养中, 甜玉米的愈伤诱导率在 40% 左右, 而糯玉米的愈伤诱导率高达 80%; 在抗性筛选培养基上已成功获得抗性愈伤组织, 经 PCR 鉴定愈伤组织基因组中分别含有正常和突变的目的片段, 这表明成功构建了玉米端粒酶 RNA 候选序列的转基因鉴定体系, 为进一步鉴定相关候选序列提供有效的技术方法。

关键词: 甜玉米; 糯玉米; 端粒酶 RNA 模板基因候选序列; 农杆菌介导法; 抗性愈伤组织

中图分类号: Q785

文献标志码: A

0 引言

端粒是真核细胞线性染色体末端由核酸和端粒结合蛋白所构成的特殊结构, 其中核酸部分由富含鸟嘌呤的重复序列串联而成, 对稳定染色体发挥作用^[1]。细胞每进行一次分裂, 端粒就会丢失部分碱基, 当端粒长度缩短到临界值时, 细胞分裂就会停止并出现衰老和死亡, 故端粒被称为细胞的“有丝分裂钟”^[2]。端粒在保护染色体末端、引导同源染色体配对、保证 DNA 复制完整等方面起着重要作用。

端粒酶是一种由端粒酶 RNA 组分、端粒酶相关蛋白和端粒酶催化亚基 3 部分组成^[3]的核糖核蛋白酶, 它作为逆转录酶, 参与端粒序列的合成。其中端粒酶 RNA 组分是端粒酶作用的模板, 利用端粒酶的逆转录酶活性识别并结合到端粒末端序列上, 反转录延伸端粒缩短的序列加到染色体 3' 末端延伸端粒长度。端粒酶催化亚基^[4]是维持端粒酶活性的核心成分之一, 在永生细胞中表现出高表达。植物细胞共用一套端粒酶 RNA 模板基因序列, 端

粒酶 RNA 模板基因序列尤为重要^[5]。如果改变端粒酶 RNA 模板基因序列就会导致整个玉米基因组端粒末端重复序列的改变, 影响遗传物质的稳定性。目前, 尚未见有关玉米端粒酶 RNA 模板基因序列克隆的报道, 而现在的研究就是致力于这一方面。

本研究将玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列插入 pCAMBIA 1301 穿梭质粒, 采用电击法^[6]转化农杆菌感受态细胞, 以玉米端粒酶 RNA 模板基因-pCAMBIA 1301-农杆菌体系的形式侵染玉米成熟胚诱导的愈伤组织, 以构建玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列转基因鉴定体系。玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列转基因鉴定体系的构建, 为继续鉴定候选序列提供了有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒、菌株及植物材料: pMD18-T, pCAMBIA 1301 质粒、大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 LBA 4404 由本实验室提供, 糯玉米、甜玉米购于杭州下沙农贸市场。

收稿日期: 2012-11-07

作者简介: 郑洁(1988-), 女, 浙江乐清人, 硕士研究生, 研究方向为端粒与端粒酶。

通信作者: 刘小川, 电子邮箱: xcliu@zstu.edu.cn

试剂: dNTP、rTaq 酶、PCR 回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、 $10\times$ PCR Buffer、1% BSA、*Nco* I、*Afl* II、 N_6 培养基、L-脯氨酸、水解酪蛋白(CH)、2, 4-D、蔗糖、植物凝胶、Kan、头孢霉素(Cef)、潮霉素 B(Hyp)购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 培养基

诱导培养基: N_6 培养基+L-脯氨酸 500 mg/L+2, 4-D 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 2.75 g/L, pH=5.8。

继代培养基: N_6 培养基+CH 500 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 2.75 g/L, pH=5.8。

共培养培养基: N_6 培养基+CH 500 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L+AS 100 μ mol/L+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 2.75 g/L, pH=5.8。

抗性愈伤筛选培养基: N_6 培养基+CH 500 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L+Kan 100 mg/L+Cef 500 mg/L+Hyp 7 mg/L+蔗糖 30 g/L+植物凝胶 2.75 g/L, pH=5.4。

1.3 方法

1.3.1 玉米端粒酶RNA模板基因候选序列和端

粒酶RNA模板定点突变候选序列的扩增

首先以玉米基因组作为模板,根据候选序列,用WDNASIS软件设计引物,引物序列PF₁、PR₁、P₃、P₄,其中PF₁带有*Nco* I酶切位点,PR₁带有*Afl* II酶切位点。利用PF₁/PR₁作为引物,玉米基因组作为模板进行PCR反应,获得野生型基因;以PF₁/P₄作为引物,野生型基因作为模板进行PCR反应获得小片段序列;以PR₁/P₃作为引物,野生型基因作为模板进行PCR反应获得大片段序列;以PF₁/PR₁作为引物,大片段和小片段序列等量混合作为模板通过重叠延伸PCR法获得突变型基因,PCR产物进行凝胶电泳。

1.3.2 玉米端粒酶RNA模板基因-pCambia 1301体系的构建

将野生型基因与突变型基因切胶回收,分别与pMD18-T连接,连接成功后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,震荡复苏培养后取菌液100 mL涂于含AMP终浓度为100 μ g/mL的琼脂平板上,同时进行菌落PCR鉴定,分别抽提野生型基因-pMD18-T和突变型基因-pMD18-T质粒进行双酶切鉴定,酶切条带用PCR回收试剂盒回收,并将菌液送往上海生工生物工程股份有限公司测序来确定野生型基因和突变型基因。

对野生型基因-pMD18-T、突变型基因-pMD18-T、pCambia 1301同时双酶切,使用限制性内切酶*Nco* I、*Afl* II,回收酶切条带,连接野生型基因与pCambia 1301、突变型基因与pCambia 1301。

连接结束后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,摇菌,涂于含有Kan的LB板上,37℃培养12 h。对连接产物进行PCR菌落鉴定和双酶切鉴定,鉴定正确后采用电击法转化农杆菌感受态细胞。Bio-Rad电击转化仪参数为:C=25 μ F,V=2.4 kF,电击杯杯径2.0 mm。

1.3.3 农杆菌介导转化愈伤组织及抗性愈伤组织的获得

1.3.3.1 农杆菌侵染液的制备

将携带pCambia 1301质粒(两种类型,分别含有端粒酶RNA模板候选序列和定点突变的端粒酶RNA模板候选序列)的农杆菌LBA 4404从-80℃冰箱取出,在含Kan的YEB固体培养基上划线,28℃暗培养至长出1 mm大小的单菌落,挑取单菌落转接于含Kan的液体培养基,280 r/min,28℃振荡培养直至菌液浓度达到OD₆₀₀=0.5左右^[7]。

1.3.3.2 愈伤组织的诱导及农杆菌转化

选择糯玉米、甜玉米作为组培材料,先将成熟玉米种子浸泡在无菌双蒸水中,4℃放置36 h,种子表面用70%酒精消毒30 s,无菌双蒸水冲洗4~5次,再用2%次氯酸钠消毒2.5 min,无菌双蒸水冲洗4~5次,最后在超净台上取玉米成熟胚,沿中轴切成两份,切面置于诱导培养基上,28℃暗培养,糯玉米和甜玉米分别制备了7个诱导板,材料每8天继代1次,共进行3次继代培养。

准备2个无菌平板,标记为1号和2号,收集愈伤组织,每种处理选取7皿,每皿30块愈伤组织,收集愈伤组织,平均分配在1号和2号平板中。1号平板倒入含野生型基因的农杆菌侵染液,2号平板倒入含突变型基因的农杆菌侵染液,侵染时间为10 min,每隔2 min震荡1次,10 min之后用滤纸吸干菌液,共培养培养基(AS使用浓度为100 μ mol/L)培养3 d。将愈伤组织转接于抗性愈伤筛选培养基^[8-9],每隔15 d将较新鲜的愈伤组织进行转接,直到获得稳定生长的抗性愈伤组织。

1.4 抗性愈伤组织分子检测

整合到玉米DNA上的端粒酶RNA候选序列两端携带了农杆菌的部分序列,根据整合的农杆菌序列,用WDNASIS软件设计上下游引物,引物序列见表1。P₅/P₆扩增片段包含了端粒酶RNA候选序列,扩增片段大小约在1 100 bp。分别对正常

愈伤组织、含野生型基因的愈伤组织和含突变型基因的愈伤组织的 DNA 进行分子检测。

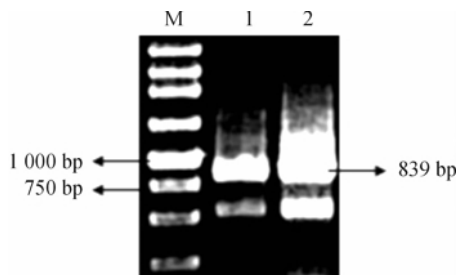
表 1 转基因鉴定的引物序列

引物	核酸序列
P ₅	5'-TTCATTTGGAGAGAACACGG-3'
P ₆	5'-CGCGCGATAATTTATCCTAG-3'

2 结果和分析

2.1 玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列和端粒酶 RNA 模板突变基因候选序列的扩增

成功从玉米基因组中获得端粒酶 RNA 模板基因候选序列,并通过重叠延伸 PCR 法获得端粒酶 RNA 模板突变基因候选序列,对 PCR 产物进行电泳鉴定。结果发现,在 Marker 750 bp 条带附近有明显的目的条带,大小与预期的 839 bp 相符(图 1)。PCR 回收试剂盒回收片段分别与 pMD18-T 载体连接得到重组质粒,并成功转化到大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中,经 PCR、双酶切、DNA 测序等鉴定方法证明玉米野生型基因-pMD18-T、玉米突变型基因-pMD18-T 体系构建成功。

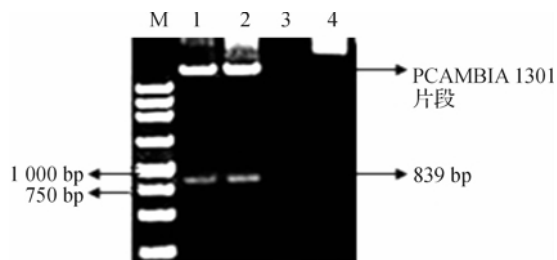


M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1. 目标片段; 2. 突变片段

图 1 玉米端粒酶 RNA 模板基因候选和突变基因候选序列 PCR 扩增结果

2.2 野生型基因-pCambia 1301 和突变型基因-pCambia 1301 体系构建

经双酶切鉴定野生型基因-pCambia 1301 和突变型基因-pCambia 1301 连接体系构建成功(图 2)。



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1. 目标片段和 pCambia 1301 片段; 2. 突变片段和 pCambia 1301 片段; 3. 没加样品; 4. 阴性对照

图 2 野生型基因-pCambia 1301、突变型基因-pCambia 1301 双酶切结果

2.3 农杆菌介导转化愈伤组织及抗性愈伤组织的获得

2.3.1 不同品种玉米愈伤组织生长状况比较

接种在 N₆ 诱导培养基上两个品种玉米成熟胚,糯玉米成熟胚 2~3 d 开始膨大,5~6 d 成熟胚明显愈伤化。甜玉米成熟胚膨大较慢,愈伤化现象不明显。以后随着生长期的延长,表现出不同的愈伤化情况(图 3)。

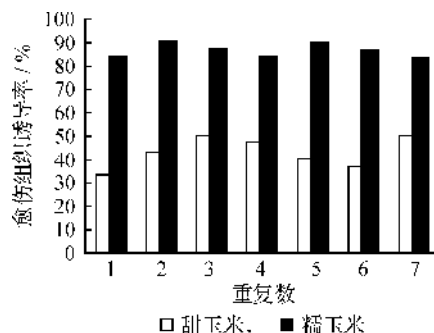
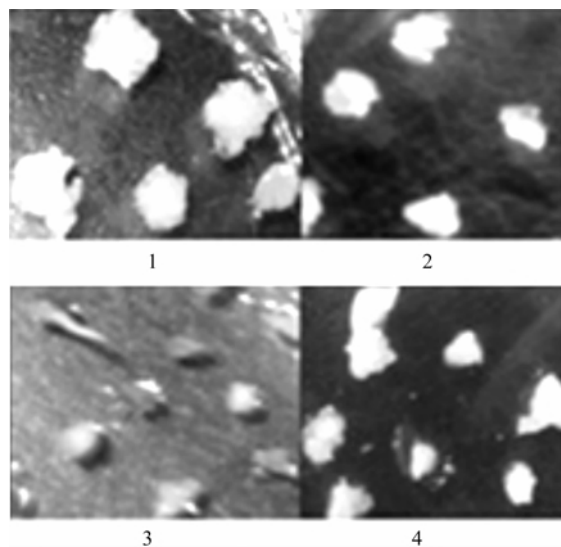


图 3 甜玉米成熟胚与糯玉米成熟胚愈伤诱导率比较

从图 3 中可以看出甜玉米的愈伤诱导率在 40% 左右,而糯玉米的愈伤诱导率高达 80%。多次重复实验可见,使用本研究的诱导培养基配方,甜玉米成熟胚愈伤诱导率低并不是偶然现象,最终选定糯玉米作为最佳组培材料。

2.3.2 组织培养结果

从图 4 中看出,成熟胚在诱导培养基上诱导出愈伤组织,经过继代、农杆菌侵染、共培养、抗性筛选几个过程,在筛选初期抗性愈伤组织出现短期死亡,后期侵染成功的愈伤组织重新生长,两次继代最终获得稳定生长的抗性愈伤组织。



1. 诱导培养愈伤组织; 2. 共培养愈伤组织; 3. 初期抗性筛选愈伤组织; 4. 多次继代最终获得的抗性愈伤组织

图 4 各种类型愈伤组织培养结果

2.4 抗性愈伤组织的分子检测

分子检测结果(图5)显示,在正常愈伤组织的DNA中检测不到目的条带,而在野生型和突变型愈伤组织的DNA中检测到了目的条带,大小与预期的1100 bp相符,说明玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列和定点突变的端粒酶 RNA 模板基因候选序列成功转入对应的玉米愈伤组织的DNA中,玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列转基因鉴定体系构建成功。



M:100 bp DNA Ladder Marker;1. 正常愈伤组织;2. 野生型目的条带;3. 突变型目的条带

图5 抗性愈伤组织 PCR 检测结果

3 讨论

玉米端粒是位于玉米染色体末端的串联重复序列 5'-TTTAGGG-3'^[10],在实验中构建两个体系,一个是玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列转基因体系,一个是对候选序列进行了定点突变的转基因体系。在玉米端粒酶 RNA 模板基因候选序列转基因体系中,端粒末端的串联重复序列仍为 5'-TTTAGGG-3',而在候选序列定点突变的转基因体系中,端粒末端重复序列变为 5'-TTTTGGG-3'。比较两个体系愈伤组织全基因组 DNA,分析两个体系中端粒序列的变化是否与预期的结果一致。同时比较两个体系愈伤组织端粒酶活性,在酶促体系中不提供 dATP 的情况下,重复序列 5'-TTTAGGG-3'因为缺少 dATP 无法延伸,而 5'-TTTTGGG-3'能够延伸。成功构建端粒酶 RNA 模板基因候选序列

转基因鉴定体系,为继续鉴定候选序列奠定了坚实基础,也对转基因玉米的研究拓宽了思路。

本实验发现以甜玉米做为植物材料,成熟胚愈伤诱导率在 40%左右,而糯玉米成熟胚愈伤诱导率高达 80%,可见不同品种玉米愈伤组织诱导需要的培养基成分及 pH 值存在差异,选择最佳组培材料给实验的顺利进行节省了大部分时间。

参考文献:

- [1] McClintock B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1939, 25(8): 405-416.
- [2] Harley C B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? [J]. Mutat Res, 1991, 256: 271-282.
- [3] Blackburn E H, Greider C W, Szostak J W. Telomeres and telomerase: the path from maize, tetrahymena and yeast to human cancer and aging[J]. Nat Med, 2006, 12(10): 1133-1138.
- [4] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization [J]. Cell, 1997, 90(4): 785-795.
- [5] Davis A J, Siu L L. Telomerase: therapeutic potential in cancer[J]. Cancer Invest, 2000, 18(3): 269-277.
- [6] Taketo A. DNA transfection of escherichia coli by electroporation[J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 949(3): 318-324.
- [7] 王宏伟,梁业红,史振声,等. 农杆菌介导玉米愈伤遗传转化研究[J]. 玉米科学, 2011, 19(3): 73-75.
- [8] 王国英,张宏,丁群星,等. 几种玉米基因转移技术的研究及转基因植株的获得[J]. 生物工程学报, 1996, 12(1): 45-49.
- [9] 孙红炜,尚佑芬,杨崇良,等. 影响玉米愈伤组织诱导和植株再生的有关因素研究[J]. 山东农业科学, 2002 (6): 30-31.
- [10] McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in zea mays[J]. Genetics, 1941, 26(2): 234-282.

(下转第 774 页)

Study on Influence of Executive Strength of Technological Innovation Policy on Corporate Innovation Performance

CHENG Hua, LI Dong-qin, YANG Yong-feng, QIAN Fen-fen, CHEN Li-qing

(School of Economics and Management, Zhejiang Sci-tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To promote the improvement of technological innovation ability of Chinese enterprises, the central government and governments at all levels have issued a lot of technological innovation policies successively. It is very urgent to evaluate the performance of executive strength of innovation policies. This paper quantifies innovation policies according to certain standards and respectively measures the influence of executive strength of innovation policies on corporate technical performance and economic performance with data from *China Statistical Yearbook on Science and Technology* and extended production function model. The research shows that the executive strength of technological innovation policies in China can promote corporate economic performance and technical performance. In terms of the degree of influence of executive strength of technical innovation policies on invention patent application of medium-and large-sized enterprises, the order is eastern coastal region, central region, northwest region, southwest region and northeast region in descending order. Finally, this paper puts forward countermeasures and suggestions for improving Chinese technical innovation policies and regional innovation performance.

Key words: technological innovation policy; innovation performance; regional difference; empirical study

(责任编辑: 陈和榜)

(上接第 765 页)

Study on Transgenic Identification System of Corn Telomerase RNA Template Gene Candidate Sequence

ZHENG Jie, YANG Li-yuan, MA Guo-xing, MA Deng-xu, LIU Xiao-chuan

(Bioengineering Institute, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study uses pCAMBIA 1301 shuttle plasmid and LBA 4404 bacterial strain for dip dyeing of callus induced by mature embryo of different species of corns so as to establish transgenic identification system of corn telomerase RNA candidate sequence; establishes two pCAMBIA 1301 shuttle plasmids containing corn telomerase RNA, one of which carries corn telomerase RNA candidate sequence with normal template area(wild type) and the other of which carries telomerase RNA candidate sequence with site-specific mutagenesis of template area(mutation type); then respectively dip-dyes the callus induced by mature embryo of sweet corn and waxy corn. The result shows that the callus induction rate of sweet corn is about 40% and that of waxy corn is 80% in callus culture; in terms of resistance screening culture medium, resistance callus has been successfully obtained; PCR identification shows that callus genome respectively contains normal and mutational target fragment. This means that transgenic identification system of corn telomerase RNA candidate sequence has been successfully established, thus providing effective technique for further identifying relevant candidate sequences.

Key words: sweet corn; waxy corn; telomerase RNA template gene candidate sequence; agrobacterium-mediated method; resistance callus-mediated transformation; Resistant callus

(责任编辑: 许惠儿)